The Effect of continuous aerobic exercise with *Citrus aurantium* L. on the expression of HM and MOTS-C genes in the mitochondria of the liver tissue of aged rats

Saba Ahmadi, Saqqa Farajtabar Behrestaq*, Masoumeh Habibian, Babisan Askari, Amir Taghipour

Department of Physical Education and Sport Sciences, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran

Corresponding author e-mail: farajtabarp@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Aging process is associated with disruption in mitochondria and liver. The aim of this study was to was to evaluate the effect of continuous aerobic exercise with *citrus aurantium* L. on the expression of HM and MOTS-C genes in the mitochondria of the liver tissue of elderly rats.

Materials and Methods: To conduct the present experimental research, 32 elderly female rats over 14 months of age and average weight of 270 to 320 grams were divided into 4 groups of 8 including 1- Control (CN), 2- Consumption of citrus aurantium L. (CA), 3- Training (T), 4- Training and consumption of citrus aurantium L. (T+CA). During eight weeks, groups 3 and 4 ran three sessions a week with an intensity of 65-75% of the maximum running speed on the treadmill. Also, groups 2 and 4 received 300 mg/kg of CA extract intraperitoneally. 48 hours after the research protocol, gene expression levels in liver tissue were measured by real-time PCR method.

Results: Expression of HM and MOTS-C genes in CA (p=0.032 and p=0.042), T (p=0.039 and p=0.048) and T+CA (p=0.0001 and p=0.001) groups compared to CN group had a significant increase.

Conclusion: Eight weeks of T and CA alone improved the expression of genes involved in Liver cellular senescence markers of elderly rats. Also, the simultaneous effect of exercise and CA on HM was greater than the effect of each one alone.

Keywords: Training, *Citrus aurantium*, Mitochondria, HM, MOTS-C

Received: May 13, 2024 **Revised:** Jul 10, 2024 **Accepted:** Jul 23, 2024

How to cite this article: Ahmadi S, Farajtabar Behrestaq S, Habibian M, Askari B, Taghipour A. The Effect of Continuous Aerobic Exercise with Citrus aurantium L. on the expression of HM and MOTS-C genes in the mitochondria of the liver tissue of aged rats. Daneshvar Medicine 2024; 32(3):58-67. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.19122.1493

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

تاثیر تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر بیان ژن‌های HM و MOTS-C میتوکندری بافت کبد موش های بزرگ سالمند

صبا احمدی، سقا فرج‌تبار بهرستاق*، معصومه حبیبیان، بابی سان عسکری، امیر تقی پور

گروه تربیت بدنی وعلوم ورزشی، واحد قائمشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران

*نویسنده مسئول: سقا فرج تبار بهرستاق **Email: farajtabarp@yahoo.com**

چکیده

مقدمه و هدف: روند افزایش سن با اختلال در میتوکندری و کبد همراه است. هدف از این مطالعه تبیین تأثیر تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر بیان ژن‌های HM و MOTS-C میتوکندری بافت کبد رت‌های سالمند بود.

مواد و روش ها: برای انجام تحقیق آزمایشی حاضر ۳۲ سر موش صحرایی ماده سالمند بالای ۱٤ ماه سن و میانگین وزن ۲۷۰ الی ۳۲۰ گرم در ٤ گروه ۸ سری شامل ۱- کنترل (CN)، ۲- مصرف عصاره بهار نارنج (CA)، ۳- تمرین (T)، ٤- تمرین و مصرف عصاره بهار نارنج (T+CA) قرار گرفتند. در مدت هشت هفته گروه‌های ۳ و ٤ به میزان سه جلسه در هفته با شدت ٦٥ تا ۷۵ درصد حداکثر سرعت دویدن روی نوارگردان دویدند؛ همچنین گروه‌های ۲ و ٤ روزانه 300 mg/kg عصاره CA به صورت صفاقی دریافت نمودند. ٤۸ ساعت پس از پروتکل تحقیق سطوح بیان ژنی در بافت کبد به روش real- time PCR اندازه‌گیری شد.

نتایج: بیان ژن‌های HM و MOTS-C در گروه‌های CA (p=۰/۰۳۲ و p=۰/۰٤۲)، T (p=۰/۰۳۹ و p=۰/۰٤۸) و T+CA (p=۰/۰۰۰۱ و p=۰/۰۰۱) نسبت به گروه CN افزایش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: هشت هفته تمرین و مکمل به تنهایی منجر به بهبود پپتیدهای مشتق از میتوکندری در بافت کبد موش‌های صحرایی سالمند شد. همچنین اثر همزمان تمرین و CA بر HM بیشتر از اثر هر کدام به تنهایی بود.

واژه های کلیدی: تمرین، عصاره بهار نارنج، میتوکندری، MOTS-C،HM

وصول مقاله: ۱۴۰۳/۰۲/۲۴
اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۳/۰۴/۲۰
پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۲

مقدمه

میتوکندری اندامک‌های دارای اثرات مختل می‌باشد. میتوکندری سیستم اولیه تولید انرژی است و علاوه بر این، در متابولیسم، سیگنال‌دهی کلسیم و آپوپتوز شرکت می‌کنند (۱). با توجه به این عملکردهای ثابت شده میتوکندری، ممکن است که اختلال عملکرد میتوکندری منجر به مجموعه‌ای از اختلالات قابل پیش‌بینی در تمام بافت‌ها شود. همچنین، اختلال عملکرد میتوکندری با پیری طبیعی مرتبط است (۲) و با ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌های مرتبط با سن، مانند بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، و تخریب عصبی نیز مرتبط است (۳). اختلال عملکرد میتوکندری منجر به مجموعه‌ای از اختلالات در تمام بافت‌ها می‌شود. پپتیدهای مشتق شده از میتوکندری (MDPs) پروتئین‌های تازه کشف شده از میتوکندری هستند (۳). این مولکول‌ها اجزای ضروری میتوکندری بوده که مسیرهای سیگنالینگ را فعال می‌کنند و بیان ژن هسته را تعدیل می‌کنند (٤). طی روند پیری، سطح این پپتیدها کاهش یافته و منجر به کاهش عملکرد فیزیولوژیکی میتوکندری می‌شود (۵). در بین عوامل مختلف، سطوح MDP با بیماری‌های ناشی از افزایش سن مرتبط است (٦). بنابراین، اصلاح عملکرد میتوکندری به عنوان یک هدف درمانی برای پیشگیری از بیماری‌های ناشی از افزایش سن پیشنهاد شده است. به عنوان مثال، متفورمین – دارویی که بر روی میتوکندری ها اثر می کند – یک کاندید درمانی پیشرو برای پیری است که در حال حاضر در کارآزمایی‌های بالینی در مقیاس بزرگ مورد مطالعه قرار گرفته است (۷). با این‌حال، علی‌رغم اینکه داده‌هایی نشان می‌دهند که میتوکندری‌ها را می‌توان برای کاهش پیری اصلاح کرد، مولکول‌های دقیقی که این اثرات میتوکندریایی را واسطه می‌کنند نامشخص باقی مانده است. در همین رابطه مشخص شده است که سطوح برخی از MDPها با افزایش سن در موش‌ها و انسان‌ها کاهش می‌یابد، و تجویز MDPها اثرات مفیدی روی بیماری‌های مرتبط با سن از جمله آلزایمر، بیماری قلبی عروقی و دیابت نوع ۲ دارد (۸). همچنین مطالعات روی جوندگان نشان می‌دهد که MDP، متابولیسم میتوکندری را تقویت کرده و فرآیندهای حیاتی مانند پیری، التهاب و مقاومت به انسولین را تنظیم می‌کند (۹).

از طرف دیگر هومانین (HN) یک پلی‌پپتید محافظ عصبی ٢٤ اسید آمینه است که در نورون‌های سالم بیماران آلزایمر کشف شده است. HN و آنالوگ‌های HN عملکرد مهم سلولی مانند افزایش بقای سلولی، متابولیسم، پاسخ به عوامل استرس‌زا و التهاب را در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی تنظیم می‌کنند (۹). میزان HM در پلاسما و مایع مغزی-نخایی قابل اندازه‌گیری بوده و در بافت‌های مختلفی از جمله هیپوتالاموس، کبد، قلب، کلیه، روده بزرگ، بیضه‌ها، عروق و عضلات اسکلتی بیان می‌شود (۱۰). مطالعات نشان داده که سطوح در گردش خون HM در انسان‌ها و موش‌ها با افزایش سن کاهش می‌یابد (۹).

MOTS-c نیز به عنوان یک MDP، چرخه فولات، بیوسنتز پورین را فعال کرده و با فعال‌سازی پروتئین‌کیناز فعال شده با AMP 5' (AMPK) ، متابولیسم میتوکندری را تقویت می‌کند (۹). این پپتید در پلاسما، مغز، کبد و عضلات اسکلتی یافت شده و میزان آن با افزایش سن کاهش می‌یابد (۱۰). علاوه بر این HN و MOTSc تنظیم کننده‌های کلیدی حساسیت به انسولین و متابولیسم هستند. خاصیت حساسیت به انسولین MPDها قبلاً در مدل‌های سلولی و جوندگان نشان داده شده است. تجویز HN و HN-GF6A باعث کاهش گلوکز خون و افزایش حساسیت به انسولین در موش‌های دیابتی شد، در حالی که در مدل موش دیابتی غیرچاق، تجویز HN از شروع زودرس دیابت نوع ۱ جلوگیری کرد (۱۱). مشابه HN، پپتید شبه هومانین کوتاه ۲

(SHLP2) باعث کاهش تولید گلوکز کبدی و افزایش دفع گلوکز بافت محیطی در موش‌های دارای قند خون بالا

شد (۱۲). نقش MDP در حساسیت به انسولین با کشف MOTS-c بیشتر حمایت شد. بیان بیش از حد MOTS-c باعث افزایش جذب گلوکز در میوبلاست‌ها و تجویز داخل صفاقی MOTS-c باعث فعال شدن مسیر AMPK و بیان GLUT4 در عضله اسکلتی شد و مقاومت به انسولین القا شده با سن و رژیم غذایی را در موش‌ها معکوس کرد (۹). این داده‌ها نشان می‌دهد که در جوندگان، MDP در بهبود مقاومت به انسولین ناشی از دیابت نوع ۲ نقش دارد.

با توجه به مطالب فوق محققین بطور پیوسته در پی کشف روشی جهت تاثیر بر فاکتورهای مهم بر سالمندی و میتوکندری هستند در همین زمینه یکی از روش¬های مورد توجه محققین ورزش و فعالیت بدنی است بطوریکه نشان داده شده است که ورزش بیان MOTS-c رمزگذاری شده با mtDNA را در انسان القا می‌کند. درمان با MOTS-c به طور قابل توجهی عملکرد بدنی را در موش‌های جوان، میانسال و مسن بهبود می‌بخشد، متابولیسم عضلات اسکلتی و بیان بسیاری از ژن¬ها را تنظیم می‌کند و باعث افزایش سازگاری با استرس متابولیک در سلول‌های C2C12 می‌شود (۱۳). همچنین مشخص شده است که HN تأثیرات مفیدی بر متابولیسم سلولی دارد که به موازات تمرینات ورزشی، درمان برون‌زا با HN در جوندگان باعث بهبود حساسیت به انسولین، ترشح انسولین تحریک شده با گلوکز، کاهش توده چربی و بهبود عملکرد شناختی می‌شود (۱٤). مطابق با این مشاهدات، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد تمرین ورزشی ممکن است سطوح MDP را تغییر دهد، هر چند تناقضاتی نیز در یافته‌ها مشاهده شد. در پژوهشی نشان داده شد که ۱۲ هفته تمرین مقاومتی بیان HN را در عضلات اسکلتی افزایش داد، در حالی که پیاده‌روی نوردیک هوازی تاثیر معنی‌داری نداشت (۱۵).

همچنین با توجه به هزینه‌های فراوان مالی برای درمان بیماری‌های مرتبط با افزایش سن به خصوص بیمای‌های کبدی استفاده از روش‌های غیر دارویی و مکمل‌های گیاهی می‌تواند تا حدودی باعث هزینه‌ها و عوارض داروهای شیمیایی شود. و در بین گیاهان مختلف بهار نارنج با توجه به ترکیبات مختلفی که دارد در درمان بسیاری از بیمای‌ها استفاده می‌شود. روغن‌های اصلی این گیاه لیمونن، لینالول و β-میرسن است. (۱٦). حافید و همکاران (۲۰۱۸) اثرات ضد سرطانی لیمونن را در کارسینوم سلول‌های کبدی و HepG2 نشان دادند. این محققین بیان کردند که این اثرات، ناشی از رفتارهای آنتی‌اکسیدانی و پراکسیدانی فلانوئیدها می‌باشد (۱۷). علاوه بر این مطالعه زاهو و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که بهار نارنج از طریق تاثیر بر تنظیم کاسپاز ۳ و p53 باعث مهار سلول‌های سرطانی می‌شود (۱۸). با توجه به کاهش فرآیندهای فیزیولوژیکی در اثر پیری، و تاثیر پیری بر عملکرد کبد، به نظر می‌رسد فعالیت‌های بدنی و بهار نارنج تاثیر مفیدی بر بهبود عملکرد متابولیکی کبد در افراد مسن داشته باشد. با این وجود مکانیزم‌های سلولی فعالیت ورزشی و بهار نارنج به خوبی شناسایی نشده است. همچنین فرض محقق این است که اثر همزمان تمرین هوازی و بهار نارنج تاثیر بهتری بر این عوامل نسبت به اثر هر کدام به تنهایی دارد. بنابراین محقق درصدد پاسخگویی به این سوال است که آیا تمرین هوازی تداومی همراه با مصرف بهار نارنج بر پپتیدهای مشتق از میتوکندری بافت کبد رت‌های سالمند تاثیر دارد؟

مواد و روش‌ها

برای انجام تحقیق آزمایشی حاضر بر اساس نتایج تحقیقات پیشین، در سطح معنی‌داری ۵ درصد (خطای نوع اول) و توان آماری ۹۵٪ (خطای نوع دوم) و با استفاده از نرم افزار Medcalc 18.2.1 ۳۲ سر موش صحرایی سالمند ماده با سن تقریبی بالای ۱٤ ماه و محدوده وزنی ۲۷۰ تا ۳۲۰ از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت به عنوان نمونه خریداری شد و جهت آشنایی با محیط جدید و یک هفته قبل از شروع

پروتکل در قفس‌های جنس پلی کربنات شفاف با قابلیت اتو کلاو آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه آزاد مرودشت نگهداری شدند. برای جذب ادرار و مدفوع حیوانات و راحتی آنها از تراشه و بریده‌های چوب استریل استفاده شد. همچنین یک روز در میان شستشوی قفس‌ها انجام شد و تراشه‌های چوب نیز تعویض گردید. دمای مطلوب سالن نگهداری حیوانات ۲۰ تا ۲٤ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی حدود ۵۵ تا ٦۵ درصد کنترل و ثبت شد. چرخه روشنایی– تاریکی نیز هر ۱۲ساعت یکبار به طور دقیق توسط تنظیم کننده الکترونیکی نور سالن نگهداری حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد. همچنین غذای مورد نیاز موش‌ها، از خانه‌ی حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت تهیه و به صورت نامحدود در اختیار حیوانات قرارگرفت. آب مورد نیاز نیز به صورت آزاد در بطری‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر ویژه حیوانات آزمایشگاهی تأمین شد. پس از دوره آشناسازی، موش‌ها به طور تصادفی به گروه‌های کنترل (CN)، مصرف عصاره بهار نارنج (CA)، تمرین تداومی با شدت متوسط (T)، تمرین تداومی با شدت متوسط و مصرف عصاره بهار نارنج (T+CA) تقسیم شدند.

پروتکل تمرینی

در ابتدای هر جلسه مرحله گرم کردن انجام شد و به دنبال آن گروه‌های تمرین، تمرین خود را انجام دادند. تمرین تداومی با شدت متوسط (MIT) ٪٦۵ VO2max که معادل سرعت ۲۰ متر/دقیقه و زمان ۱۵ دقیقه در هفته‌ی اول شروع شده که تدریجاً به سرعت ۲۵ متر/دقیقه و زمان ۳۱ دقیقه در هفتهٔ هشتم رسید. شروع تمرین با گرم کردن به مدت ۳ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه و ۲ دقیقه با شدت ۱۵ متر و سرد کردن به مدت ۱ دقیقه با شدت ۱۵ متر در دقیقه و ۲ دقیقه با شدت ۱۰ متر در دقیقه به پایان رسید (۱۹). همچنین گروه‌های مصرف عصاره بهار نارنج روزانه ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن عصاره بهار نارنج را به صورت صفاقی دریافت کردند (۲۰).

پس از اعمال متغیر مستقل، تمام نمونه‌ها با شرایط کاملاً مشابه و در شرایط پایه (٤۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و ۱۲ تا ۱٤ ساعت ناشتایی) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از کتامین (٦۰mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg) بی‌هوش شدند. بافت مورد نظر بلافاصله پس از جداسازی، وزن‌کشی و شست و شو، هموژنیز شد و جهت ارزیابی‌های بعدی در تانک ازت غوطه ور و پس از ۱۰ دقیقه به دمای فریزر ۸۰- انتقال داده شد. پس از آن برای بررسی بیان ژن‌های HM و MOTS-C، ابتدا با استفاده از کیت ستونی استخراج RNA (FavorPrep™ Tissue Total RNA Mini Kit) ساخت کشور هنگ کنگ، کل محتویات RNA سلول (total RNA) استخراج شد. پس از استخراج RNA سنتز cDNA طبق دستورالعمل موجود در کیت فرمنتاز (K1621) تهیه گردید. واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آنزیم RevertAid™M-MuLV Reverse transcriptase صورت گرفت. در ادامه و جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از Real-time PCR تمام پرایمرها توسط نرم افزار Allele IDv7.8 طراحی شد. جهت اطمینان از عدم تکثیر DNA ژنومی از ۲۵ نانوگرم cDNA و ۲۵ نانوگرم RNA در تیوب‌های جداگانه از واکنش PCR و به کارگیری از ژل آگاروز ۱/۵٪ استفاده شد. تکثیر cDNA و مشاهده باند مورد انتظار توسط پرایمر اختصاصی و عدم تکثیر RNA پس از واکنش PCR نمایانگر عدم تکثیر DNA ژنومی می‌باشد. سپس برای هر یک از پرایمرها کارایی PCR اندازه‌گیری و منحنی استاندارد برای آنها رسم گردید. توالی پرایمرهای MOTS-c و HM همراه ژن کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای MOTS-c و HM به همراه ژن کنترل

Genes	Primer Sequences
β2m	Forward: 5'-GCGGGGTCATGAAATCCAGT -3'
	Reverse: 5'-AGTGATGTGGGGACAAAACGA -3'
MOTS-c	Forward: 5'-CAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'
	Reverse: 5'-AGGGTGACGGGCGGTGTGT-3'
HM	Forward: 5'-AATCACTTGTTCCTTAAATAGGGACC-3'
	Reverse: 5'-GAACCCTCGTGGAGCCATT-3'

تجزیه و تحلیل آماری

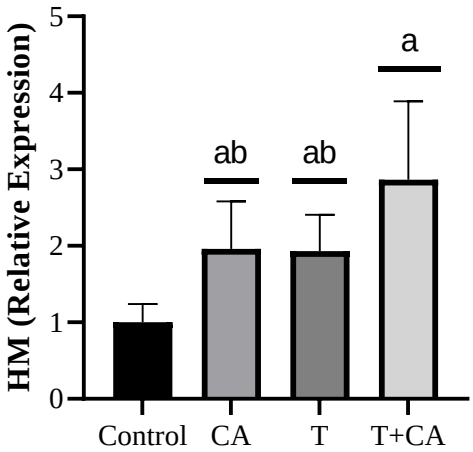
توصیف کمی داده‌ها با استفاده از شاخص‌های پراکندگی مرکزی از قبیل میانگین و انحراف استاندارد انجام شد و جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک و بررسی تجانس واریانس‌ها از آزمون لوین استفاده گردید. هم چنین برای بررسی تغییرات معنی‌داری هریک از متغیرهای تحقیق، بین گروه‌های مختلف، از روش آنالیز واریانس یک راهه و در صورت مشاهده تفاوت معنادار آماری از آزمون تعقیبی توکی جهت تعیین محل اختلاف بین گروهی استفاده شد. سطح معناداری برای تمام محاسبات $p \leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. کلیه عملیات آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد.

نتایج

نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه داده‌های مربوط به متغیر HM بافت کبدی با توجه به میزان F=۱۰/۸۳۲ و P=۰/۰۰۰۱ اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های (CN، CA، T و T+CA) نشان داد. در ادامه نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه‌های CN با CA (p=۰/۰۳۲)، T (p=۰/۰۳۹) و T+CA (p=۰/۰۰۰۱) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. همچنین بین گروه‌های T+CA با گروه‌های CA(p=۰/۰٤٦) و T (p=۰/۰۳۷) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲ و نمودار ۱).

جدول ۲. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه HM بافت کبدی در گروه‌های مختلف پژوهش

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار**F**	سطح معنی داری
بین گروه ها	۱۳/۹۳۷	۳	٤/٦٤٦	۱۰/۸۳۲	۰/۰۰۰۱
داخل گروه ها	۱۲/۰۰۸	۲۸	۰/٤۲۹		
مجموع	۲۵/۹٤۵	۳۱			

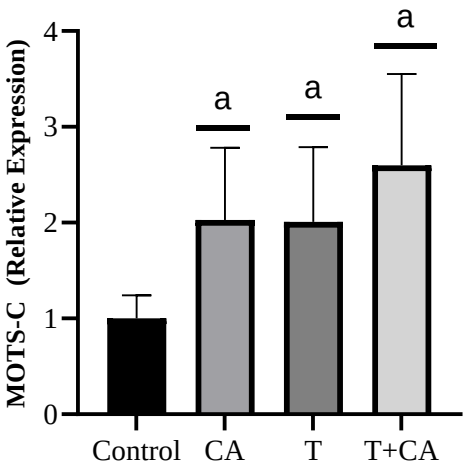


نمودار ۱. تغییرات بیان **HM** بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح **P<۰/۰۵**).**a** تفاوت با **CN** ، **b** تفاوت با گروه **T+CA**. کنترل (**CN**)، مصرف عصاره بهار نارنج (**CA**)، تمرین تداومی با شدت متوسط (**T**)، تمرین تداومی با شدت متوسط و مصرف عصاره بهار نارنج (**T+CA**)

یافته دیگر تحقیق حاضر نشان داد بین میانگین تغییرات **MOTS-C** در گروه‌های مختلف تمرین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (**F=**٦/٥٨٨ و **P=**٠/٠٠٢). همچنین نتایج آزمون تعقیبی توکی نشان داد بین گروه-های **CN** با **CA** (**p=**٠/٠٤٢)، **T** (**p=**٠/٠٤٨) و **T+CA** (**p=**٠/٠٠١) تفاوت معنی‌داری وجود دارد. در دیگر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۳ و نمودار ۲).

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه MOTS-C بافت کبد در گروه‌های مختلف پژوهش

	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار**F**	سطح معنی داری
بین گروه ها	١٠/٦٠٧	٣	٣/٥٣٦	٦/٥٨٨	٠/٠٠٢
داخل گروه ها	١٥/٠٢٦	٢٨	٠/٥٣٧		
مجموع	٢٥/٦٣٣	٣١			



نمودار ۲. تغییرات بیان **MOTS-C** بافت کبدی در گروه‌های مختلف با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (در سطح **P<**٠/٠٥).**a** تفاوت با **CN.** کنترل (**CN**)، مصرف عصاره بهار نارنج (**CA**)، تمرین تداومی با شدت متوسط (**T**)، تمرین تداومی با شدت متوسط و مصرف عصاره بهار نارنج (**T+CA**).

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که T و CA به تنهایی و همزمان با هم باعث افزایش بیان HM در بافت کبد رت‌های سالمند شد. همچنین T به تنهایی و در ترکیب با CA توانست بیان MOTSc را در بافت کبد رت‌های سالمند افزایش دهد. همراستا با پژوهش حاضر دیلی‌کونورایت و همکاران (۲۰۲۱) نشان دادند که ١٦ هفته تمرین ترکیبی هوازی-مقاومتی باعث افزایش بیان پلاسمایی MOTS-c در زنان دارای سرطان سینه شده، که این تغییرات با کاهش توده چربی، وزن، CRP و HOMA-IR همراه بود (۲۱). همچنین، گیدلوند و همکاران (٢٠١٦) برای اولین بار گزارش دادند که میزان پروتئین HM در عضلات اسکلتی مردان پیش‌دیابتی میانسال به دنبال ۱۲ هفته تمرین مقاومتی افزایش یافت. در این کارآزمایی، شرکت کننده‌گان به سه گروه کنترل، تمرین مقاومتی و راه رفتن نوردیک تقسیم شدند. شرکت کنندگان سه بار در هفته به مدت ٦٠ دقیقه در هر جلسه تمرین را اجرا کردند. نتایج نشان داد که علیرغم افزایش در پروتئین HM عضلانی، تمرین مقاومتی و پیاده روی نوردیک با شدت کم غلظت پلاسمایی HM را تغییر نداد (١٥). اخیراً در مطالعات حیوانی، گوو و همکاران (۲۰۲۰) (۲۲) و یانگ و همکاران (۲۰۲۱) (۲۳) در موش‌های چاق و لاغر نشان دادند که هشت هفته دویدن روی تردمیل، باعث افزایش بیان MOTS-c عضلانی و پلاسمایی می‌شود. با این وجود وود هد و همکاران (۲۰۲۰) در مطالعه‌ی نشان

دادند که ۲ هفته تمرین تناوبی با شدت بالا علیرغم بهبود در عملکرد ورزشی و افزایش عملکرد میتوکندری تاثیری بر بیان HM عضلانی ندارد (۲٤). تفاوت در نتایج ممکن است ناشی از مداخلات تمرین (تعداد هفته‌ها و نوع فعالیت ورزشی) و یا وضعیت سلامتی شرکت کنندگان (افراد دیابتی در مقابل افراد سالمند دارای اضافه وزن) باشد. همچنین وود هد و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که ممکن است تمرین ورزشی MDP را در افرادی که از سلامت متابولیکی کمتری برخوردار هستند، بیشتر افزایش دهد و این تغییرات تلاشی برای بازگرداندن تعادل متابولیکی می‌باشد (۲۵). در مطالعات حیوانی نشان داده شده که HM و MOTS-c در پیشگیری از بیماری‌های مرتبط با سن مانند دیابت نوع ۲ و بیماری قلبی عروقی نقش بالقوه داشته است. مطالعات نشان می‌دهد سطوح HM بعد از ۵۰ سالگی شروع به کاهش پیدا کرده و این روند با افزایش سن ادامه پیدا می‌کند (۹). درمان با MOTS-c در موش‌های پیر باعث به تاخیر انداختن فرآیند پیری و بهبود توانایی جسمانی شده، که به نظر با تاثیر بر ارگان‌های مختلف بخصوص میتوکندری و عملکرد آن مرتبط بوده است (۲٦). شواهد امیدوار کننده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد بین اثر فعالیت ورزشی و بهبود MDP ارتباطی وجود دارد. همچنین نشان داده شده که شباهت‌هایی در سازگاری‌های ناشی از فعالیت ورزشی بین HM و MOTS-c وجود داشته که نشان می‌دهد این دو پپتید با هم هماهنگ عمل کرده و مسیرهای سیگنالینگ مشابه‌ای دارند (۲۱). علاوه بر تمرینات ورزشی، گوو و همکاران (۲۰۲۰) شواهدی ارائه کرده‌اند که نشان می‌دهد آدیپوکاین آدیپونکتین می‌تواند از طریق مسیر APPL1 و سروتوئین-۱ (SIRT-1) برای تولید و ترشح MOTS-c عضلانی تاثیر داشته باشد (۲۲).

در حال حاضر به طور گسترده پذیرفته شده است که ورزش هوازی منظم یکی از روش های درمانی و پیشگیرانه برای اختلالات متابولیک است، و اثرات مفید آن توسط سیگنال دهی ناشی از ورزش هوازی، مانند AMPK و SIRT1 می‌باشد (۲۷). اولین گزارش در مورد MOTS-c توسط لی و همکاران نشان داده است که اثر محافظتی متابولیک MOTS-c به روشی وابسته به AMPK به دست آمده است، که نشان می دهد ورزش هوازی و MOTS-c مسیر سیگنال دهی یکسانی را در عضله اسکلتی دارند (۹). علاوه بر این، یک مطالعه اخیر نشان داد که ۲ هفته تزریق MOTS-c ظرفیت دویدن را در موش‌های جوان و پیر افزایش می‌دهد (۱۳). اگرچه اهداف مولکولی MOTS-c هنوز شناسایی نشده‌اند، این مشاهدات نشان می‌دهد که MOTS-c دارای اثرات تقلیدی تمرینات ورزشی هوازی بالقوه است.

در انسان، ورزش استقامتی با شدت بالا (دوچرخه سواری) باعث افزایش غلظت پلاسمایی هومانین، SHLP-6، و MOTS-c و همچنین بیان ماهیچه‌های اسکلتی انسانین و MOTS-c شد (۲۸-۲٤). افزایش حاد ناشی از ورزش در بیان MOTS-c در خون و عضله چندین ساعت بعد به سطح اولیه بازگشت (۱۳). تغییرات ناشی از ورزش در MDP ها ممکن است با توجه به انواع ورزش متفاوت باشد. فون والدن و همکاران (۲۹) نشان دادند که سطوح هومانین پلاسما در طی تمرینات پس از استقامت (دوچرخه سواری) افزایش یافت اما پس از تمرین مقاومتی (پرس پا و اکستنشن) بدون تغییر باقی ماند .دوازده هفته ورزش استقامتی (پیاده روی نوردیک) در مردان مسن مبتلا به پیش‌دیابت باعث افزایش سطح پروتئین هومانین در سرم شد، اما نه در عضلات اسکلتی (۱۵). شانزده هفته تمرین ترکیبی استقامتی و مقاومتی باعث افزایش سطح MOTS-c در خون بازماندگان سرطان سینه غیر اسپانیایی شد (۲۱). در مقابل، ۲ هفته دوچرخه سواری با شدت بالا در مردان جوان و ۸ هفته ورزش استقامتی در زنان مبتلا به سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، سطح بیان انسانین، SHLP-2 یا MOTS-c را در خون و عضلات اسکلتی تغییر نداد (۳۰).

از دیگر نتایج پژوهش حاضر افزایش HM و MOTS-c به دنبال مصرف CA بود. فلاوانون‌ها، فلاونوئیدهای اصلی موجود در CA هستند. نتیجه مطالعه‌ای نشان داده که فلاونوئید گلیکوزیداز موجود در مرکبات می‌تواند باعث فعال شدن مسیر AMPK-SIRT1-PGC-1α شود (۱۷). همچنین نشان داده شده که نارنژین باعث افزایش بیان PGC-1α، CPT1 و آدیپونکتین می‌شود (۱۸). به نظر می‌رسد نارنژین موجود در CA می‌تواند با افزایش

ترموژنز از مسیر UCP1 باعث افزایش بیان PGC-1α و PGC-1β شود (۱۸). از آنجایی که CA باعث افزایش آدیپونکتین در گردش شده و می‌تواند بر مسیر AMPK و SIRT-1 تاثیر داشته باشد، احتمالا از این مسیر می‌تواند بر MDP تاثیر داشته باشد. در مطالعه‌ای روی حیوانات نشان داده شده که یک هفته درمان با آنالوگ آدیپونکتین Acrp30 باعث افزایش MOTS-c در خون و عضلات می‌شود (۳۱). این نتایج نشان می‌دهد که احتمال دارد CA نیز از این مسیر بر MDP تاثیر داشته و باعث بهبود عملکرد میتوکندری شود. همچنین به نظر می‌رسد SIRT-1 با افزایش میزان PGC-1α (۳۲) و دی‌استیله کردن آن (۲۹) نقش مهمی در بیوژنز میتوکندری‌ها داشته باشد. داده‌ها نشان می‌دهد که سیگنال آدیپونکتین ممکن است تولید و یا ترشح MOTS-c میتوکندری را، تا حدی از طریق PGC-1α، تنظیم کند (۲۲). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که اثر همزمان T و CA بر HM بیشتر از هر کدام به تنهایی بود. شاید تمرین و مکمل با اثر هم‌افزایی که داشته‌اند باعث بدست آمدن چنین نتایجی شده است. همان‌طور که اشاره شده هم فعالیت ورزشی و هم CA قادر است بر مسیر AMPK-SIRT1-PGC-1α تاثیر داشته باشد. لذا اثر هم‌زمان این دو باعث افزایش معنی‌دار در بیان HM شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت هوازی همراه با مصرف مکمل CA موجب افزایش معنی‌دار HM و MOTS-c در موش‌های سالمند شده است. فلاونون‌های موجود در CA همراه با فعالیت هوازی تاثیر دوچندانی در بهبود MDP داشته است و از این طریق باعث بهتر شدن عملکرد میتوکندری می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه دارای کد اخلاق IR.IAU.SARI.REC.1402.240 می‌باشد..

تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی ورزشی می‌باشد. بدینوسیله از تمامی اشخاصی که صمیمانه ما را در اجرای این پژوهش یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

منابع

1. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. Nature Communications 2020;11(1):102.
2. Kim S-J, Miller B, Kumagai H, Silverstein AR, Flores M, et al. Mitochondrial-derived peptides in aging and age-related diseases. Geroscience. 2021;43:1113-21.
3. Siasos G, Tsigkou V, Kosmopoulos M, Theodosiadis D, Simantiris S, Tagkou NM, et al. Mitochondria and cardiovascular diseases–from pathophysiology to treatment. Annals of Translational Medicine 2018;6:(12).
4. Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: a harbinger of mitochondrial-derived peptides? Trends in Endocrinology & Metabolism 2013;24(5):222-228.
5. Kim KH, Son JM, Benayoun BA, Lee C. The mitochondrial-encoded peptide MOTS-c translocates to the nucleus to regulate nuclear gene expression in response to metabolic stress. Cell Metabolism 2018;28(3):516-24. e7.
6. Qin Q, Delrio S, Wan J, Widmer RJ, Cohen P, Lerman LO, et al. Downregulation of circulating MOTS-c levels in patients with coronary endothelial dysfunction. International Journal of Cardiology 2018;254:23-27.
7. Barzilai N, Crandall JP, Kritchevsky SB, Espeland MA. Metformin as a tool to target aging. Cell metabolism 2016;23(6):1060-1065.
8. Yen K, Mehta HH, Kim S-J, Lue Y, Hoang J, Guerrero N, et al. The mitochondrial derived peptide humanin is a regulator of lifespan and healthspan. Aging (Albany NY). 2020;12(12):11185.
9. Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, Wan J, et al. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. Cell Metabolism 2015;21(3):443-454.
10. Nashine S, Kenney MC. Effects of mitochondrial-derived peptides (MDPs) on mitochondrial and cellular health in AMD. Cells 2020;9(5):1102.
11. Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P, et al. The neurosurvival factor Humanin inhibits β-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and

delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. Metabolism 2010;59(3):343-349.
12. Cobb LJ, Lee C, Xiao J, Yen K, Wong RG, Nakamura HK, et al. Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. Aging (Albany NY) 2016;8(4):796.
13. Reynolds JC, Lai RW, Woodhead JS, Joly JH, Mitchell CJ, Cameron-Smith D, et al. MOTS-c is an exercise-induced mitochondrial-encoded regulator of age-dependent physical decline and muscle homeostasis. Nature Communications 2021;12(1):1-11.
14. Gong Z, Su K, Cui L, Tas E, Zhang T, Dong HH, et al. Central effects of humanin on hepatic triglyceride secretion. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism 2015;309(3):E283-E92.
15. Gidlund EK, von Walden F, Venojärvi M, Risérus U, Heinonen OJ, Norrbom J, et al. Humanin skeletal muscle protein levels increase after resistance training in men with impaired glucose metabolism. Physiological Reports 2016;4(23):e13063.
16. Suntar I, Khan H, Patel S, Celano R, Rastrelli L. An overview on Citrus aurantium L.: its functions as food ingredient and therapeutic agent. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2018. doi: 10.1155/2018/7864269
17. Hafidh RR, Hussein SZ, MalAllah MQ, Abdulamir AS, Abu Bakar F. A high-throughput quantitative expression analysis of cancer-related genes in human HepG2 cells in response to limonene, a potential anticancer agent. Current Cancer Drug Targets 2018;18(8):807-815.
18. 18-Zhao H-Y, Yang L, Wei J, Huang M, Jiang J-G. Bioactivity evaluations of ingredients extracted from the flowers of Citrus aurantium L. var. amara Engl. Food Chemistry 2012;135(4):2175-2181.
19. Yazdanparast Chaharmahali B, Azarbayjani MA, Peeri M, Farzanegi Arkhazloo P. The Effect of Moderate and High Intensity Interval Trainings on Cardiac Apoptosis in the Old Female Rats. Report of Health Care 2018;4(1):26-35.
20. 20-He W, Li Y, Liu M, Yu H, Chen Q, Chen Y, et al. Citrus aurantium L. and its flavonoids regulate TNBS-induced inflammatory bowel disease through anti-inflammation and suppressing isolated jejunum contraction. International Journal of Molecular Sciences 2018;19(10):3057.
21. Dieli-Conwright CM, Sami N, Norris MK, Wan J, Kumagai H, Kim S-J, et al. Effect of aerobic and resistance exercise on the mitochondrial peptide MOTS-c in Hispanic and Non-Hispanic White breast cancer survivors. Scientific Reports 2021;11(1):1-7.
22. Guo Q, Chang B, Yu Q-l, Xu S-t, Yi X-j, Cao S-c. Adiponectin treatment improves insulin resistance in mice by regulating the expression of the mitochondrial-derived peptide MOTS-c and its response to exercise via APPL1−SIRT1−PGC-1α. Diabetologia 2020;63(12):2675-2688.
23. Yang B, Yu Q, Chang B, Guo Q, Xu S, Yi X, et al. MOTS-c interacts synergistically with exercise intervention to regulate PGC-1α expression, attenuate insulin resistance and enhance glucose metabolism in mice via AMPK signaling pathway. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease 2021;1867(6):166126.
24. Woodhead JS, D' Souza RF, Hedges CP, Wan J, Berridge MV, Cameron-Smith D, et al. High-intensity interval exercise increases humanin, a mitochondrial encoded peptide, in the plasma and muscle of men. Journal of Applied Physiology. 2020;128(5):1346-1354.
25. Woodhead JS, Merry TL. Mitochondrial-derived peptides and exercise. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2021;1865(12):130011.
26. Crimmins EM. Lifespan and healthspan: past, present, and promise. The Gerontologist 2015;55(6):901-911.
27. Fan W, Evans RM. Exercise mimetics: impact on health and performance. Cell metabolism. 2017;25(2):242-7.
28. Guan Y, Drake JC, Yan Z. Exercise-induced mitophagy in skeletal muscle and heart. Exercise and Sport Sciences Reviews 2019;47(3):151.
29. von Walden F, Fernandez-Gonzalo R, Norrbom J, Emanuelsson EB, Figueiredo VC, Gidlund E-K, et al. Acute endurance exercise stimulates circulating levels of mitochondrial-derived peptides in humans. Journal of Applied Physiology 2021;131(3):1035-1042.
30. Ramanjaneya M, Jerobin J, Bettahi I, Bensila M, Aye M, Siveen KS, et al. Lipids and insulin regulate mitochondrial-derived peptide (MOTS-c) in PCOS and healthy subjects. Clinical Endocrinology 2019;91(2):278-287.
31. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1α. Cell 2006;127(6):1109-1122.
32. Bare G-HZRJ. O. Lerin C. Kim SH Mostoslavsky R. Alt FW Wu Z. Puigserver P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. EMBO Journal 2007;26:1913-1923.